

麻痺性貝毒の機器分析法に関する研究の最新動向

Recent trends in chemical analysis
for the detection of saxitoxin and its analogues in marine organisms

渡邊 龍一
Watanabe Ryuichi

国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所環境・応用部門水産物応用開発部 安全管理グループ長
Seafood safety and Technology Division, Environment and Fisheries Applied Research Department,
Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency,
National Research and Development Agency (Group Leader)

KEYWORD ▶

麻痺性貝毒

機器分析

標準物質

化学合成

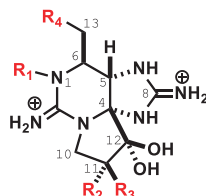
はじめに

01

四方を海に囲まれたわが国の沿岸域では、多種多様な魚介類に恵まれ、私たちの食卓を彩っている。魚介類は、私たちの貴重なたんぱく質源でもある。冷凍・冷蔵技術の発達や流通網の整備などが進み、日常的に様々な魚介類を喫食できるようになっているが、ヒスタミンのような化学物質やノロウイルス、有害微生物

を原因とする食中毒のリスク管理は食の安全上重要な課題である。さらに、水産物特有の自然毒のリスク管理は魚介類の安全な喫食において必須である。例えば、フグが有するテトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX) は強力な神経毒であるが、フグを安全に喫食するために、フグ調理師資格制度など、わが国古来の食経験に基づく独自のリスク管理体制が整備されている。また、私たちが身近に食している二枚貝は麻痺性貝毒 (Paralytic shellfish toxins, PSTs) や下痢性貝毒 (Diarrhetic shellfish toxins,

表1 二枚貝に含まれる麻痺性貝毒の主要な化学構造とその毒性等価係数



Toxins	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	CODEX TEF
STX	H	H	H	-OCONH ₂	1
neoSTX	OH	H	H	-OCONH ₂	2
dcSTX	H	H	H	-OH	0.5
dcneoSTX	OH	H	H	-OH	0.2
GTX1	OH	OSO ₃ ⁻	H	-OCONH ₂	1
GTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	-OCONH ₂	0.4
GTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	-OCONH ₂	0.6
GTX4	OH	H	OSO ₃ ⁻	-OCONH ₂	0.7
GTX5	H	H	H	-OCONHSO ₃ ⁻	0.1
GTX6	OH	H	H	-OCONHSO ₃ ⁻	0.05
dcGTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	-OH	0.2
dcGTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	-OH	0.4
C1	H	OSO ₃ ⁻	H	-OCONHSO ₃ ⁻	0.01
C2	H	H	OSO ₃ ⁻	-OCONHSO ₃ ⁻	0.1
C3	OH	OSO ₃ ⁻	H	-OCONHSO ₃ ⁻	0.01
C4	OH	H	OSO ₃ ⁻	-OCONHSO ₃ ⁻	0.1

DSTs)などを有することがあり、二枚貝の毒化原因プランクトンの監視、およびこれと連動した独特な貝毒の監視体制が整備されていることにより、安全な二枚貝を食べることができていることはあまり知られていない。本稿では、貝毒検査を実施する際の麻痺性貝毒検査法に関する最近の動向について紹介したい。

麻痺性貝毒の化学と二枚貝の毒化機構に基づく貝毒監視体制

02

麻痺性貝毒は、三環性のグアニジン骨格を基本として、4か所以上の置換基の組み合わせにより、現在60種類以上の成分が単離・構造決定されている。その中で顕著な毒性を有し、かつ二枚貝において含量の高い成分となると約15成分に限られる。表1には、現在、欧州食品安全機関(European Food Safety Authority, EFSA)が検査対象としている成分の化学構造をリスト化したものを示す¹⁾。これら毒の作用標的は電位依存性ナトリウムチャンネルであり、細胞内へのナトリウムイオンの流入を遮断することで毒性を発現する。毒成分によって作用標的への親和性が異なるため、毒力に強弱が生じ、それらはSTXを1とした時の相対毒力として表され、毒性等価係数(Toxicity equivalency factors, TEFs)と呼ばれる。主に、細胞サイズとして約20-40 μm の*Alexandrium*属や*Gymnodinium*属が二枚貝の毒化原因プランクトンであるが、これらは前述した主要毒成分を6-10種類ほど生産している。これらは細胞分裂を繰り返し海水中の密度が高くなると、養殖海域にいる二枚貝は毒化し、毒は貝の体内で代謝を受け、10-15成分ほどの多成分PSTsとして二枚貝に蓄積される。そして、ヒトが毒化二枚貝を食することにより、食中毒が発生する。ヒトへの症状は、主に口唇のしびれに始まり、運動や言語に障害が生じたのち呼吸困難となり、最悪の場合、死に至る。治療薬はなく、胃洗浄や人工呼吸器の装着などの対症療法が有効な治療法である。安全な二枚貝を提供するため、わが国では、二枚貝の毒化機構に基づき、生産海域で二枚貝の毒化原因プランクトンの発生状況を調査しており、原因プランクトンの発生が認められると、月に一回から週に一回といったように貝毒検査の頻度をあげるようになっている。現在の麻痺性貝毒検査法はマウス毒性試験(Mouse bioassay, MBA)であり、動物を用いた試験法となる。規制値は4 MU/g(MU:マウスユニット、1 MUは体

重20 gの雄マウスを15分で死に至らしめる毒量と定義されている)であり、これ以下であれば、市場に流通させて良いこととなっている。市場に流通した二枚貝は、公設試験研究機関等によって収去検査が実施され、毒化二枚貝が市場に流通していないか監視されている。一方、規制値を超える場合は、生産者による自主規制措置が講じられ、原則として3週連続で規制値を下回ることを条件に出荷が再開される。

麻痺性貝毒の機器分析法

03

麻痺性貝毒を検出・定量する方法は種々あるが、ここでは諸外国で導入が進んでいる分析装置を利用した方法を取り上げたい。機器分析法には(1)プレカラム蛍光誘導体化HPLC法²⁾、(2)ポストカラム蛍光誘導体化HPLC法^{3,4)}、(3)液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC/MS/MS法⁵⁾)の3法がある。プレカラム法およびポストカラム法ともに Association of Official Analytical Chemists(AOAC)に収載されている。LC/MS/MS法については、国際的な試験室間共同試験をAOAC法に則った形で実施しているが、J.AOAC int.への掲載にとどまっている。

プレカラム法では、PSTsを含んだ二枚貝抽出液に酸化剤(過酸化水素あるいは過ヨウ素酸)を加え、蛍光誘導体に変換させたのち(図1)、その反応液をカラムで分離して個々の成分を検出・定量する方法である。この方法の利点は、装置構成として蛍光検出器を備えたHPLCが必要になるが、それ以外に特別な装置を必要としないことである。ただし、誘導した蛍光化合物が安定ではないことや、各成分から誘導される蛍光化合物が単一ではなく複数の場合もあること、分離が不十分なものもあることから、一部の毒で定量計算が複雑になる。本法はAOAC OMA 2005.06として収載されており、EUと英国で導入されている。

ポストカラム法では、PSTsを含んだ二枚貝抽出液に簡単な前処理を行い、それをHPLCに供する。両親媒性イオンペアを含む移動相と逆相カラムを用いたイオンペアクロマトグラフィーにより分離させたのち、酸化剤(過ヨウ素酸)との反応により蛍光誘導体へと導き、酸によってラクタム環を形成させることで、プレカラム法よりも高い蛍光強度を持つ蛍光化合物へと誘導して定量

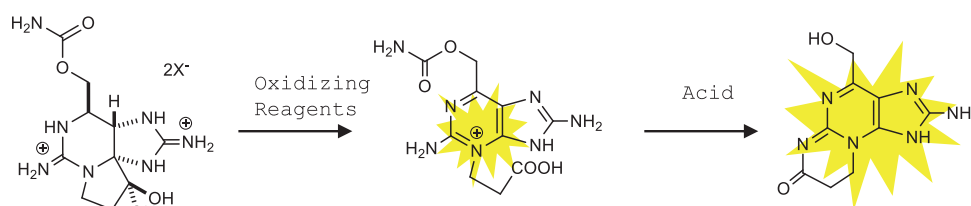


図1 麻痺性貝毒の蛍光誘導化反応

する(図1)。ただし、主要成分を一斉分離することができないため、分子の電荷に応じて2回または3回に分けて分析する必要がある。この方法の利点は、分離条件は異なるものの、ほぼ全主要成分をイオンペアクロマトグラフィーで分離できるため、正確に個々の毒の濃度を測定できる点である。しかし、ポストカラムの反応系を構築する必要があるなど、プレカラム法よりも装置構成が複雑になる。本法は、AOAC OMA 2011.02として収載されており、カナダで導入されている。近年、HPLC法の欠点であった3群分析による多検体分析にかかる長時間の煩雑な分析を、超高速液体クロマトグラフィーを利用して、4液グラジエントポンプの自動切換えと、超高速分離により、簡便かつ短時間分析を可能とした方法が報告されている⁶⁾。

LC/MS/MS法では、PSTsを含んだ二枚貝抽出液を、グラファイトカーボンを用いて簡単な前処理を行い、親水性相互作用能を有するアミドカラムを用いて毒成分を分離後、質量分析部にて検出・定量する。装置構成は比較的単純であるが、装置の導入や維持費用が高額になる。また、後述するが、二枚貝に含まれるTTXも同時検出できることが利点でもある。本法は、AOACに収載していないが、AOACの国際的な試験室間共同試験ガイドラインに準拠した形で実施しており、ニュージーランドで導入されている。公定法として多くの国々で採用されている動物検査法(MBA)とも比較的相関が高いことが知られている。

各分析法の特徴について述べてきたが、最後に機器分析移行に関する世界の動向に目を向けてみる。欧州連合(EU)は2019年1月から域内の麻痺性貝毒検査法をMBAから機器分析法へと移行した。国内への影響としては、2020年10月にEUから「検疫および植物検疫に関する措置(Sanitary and Phytosanitary measures, SPS)」に関する通報がなされ、2021年10月から施行となった。そのため、日本からEUへホタテガイ等を輸出する場合の麻痺性貝毒検査は、機器分析法で行う必要が生じている。下痢性貝毒検査法では、Codex規格に沿った形で、2017年、国内の貝毒検査法が機器分析法に完全移行した。麻痺性貝毒検査法では、下痢性貝毒と比較して考慮すべき事項が複数あるため、機器分析法への移行に際して慎重な検討が必要と思われる。これらの点にも触れながら、以下で説明したい。

麻痺性貝毒の標準物質調製に関する研究 04

麻痺性貝毒は上述した通り、多成分系で構成されていることに加え、特定物質(化学兵器の原料)であるサキシトキシン(Saxitoxin, STX)が含まれる。多成分系であるがゆえに、多くの標準物質が必要となる。現在、EFSA が機器分析で対象としている成分は16成分に及ぶ¹⁾。こうした多成分を標準物質として調製する方法を確立することに加え、STXは経済産業省によって特定物質として厳しく規制されているため、海外で市販されているSTX標準物質とそれを含んだ標準物質も輸入には許可が必要で

あり、実質的に入手はできないと言える。STXは貝毒検査における必須の検査対象成分であるため、公設試験研究機関や民間検査機関等が導入する際にSTX標準物質が入手できない事態が生じる。仮に入手できたとしても、経済産業省は非常に多くの検査機関を管理する必要がある。このようにわが国では、STX標準物質の取り扱いが困難であることから、鏡像異性体に着目して、天然型と同等の分析特性の解明に取り組んだ。

4-1. 藻類培養と化学合成による各種類縁体の調製法の開発

機器分析法を運用していくためには、まず、麻痺性貝毒の標準物質の製造技術の確立が重要であり、世界的には、藻類培養に基づく手法により調製されている。当機構においても、藻類培養と化学変換を組み合わせた麻痺性貝毒標準物質調製法を開発した(図2)。基本的には最も官能基修飾されているC1/C2を原料にしてゴニオトキシン(Gonyautoxin, GTX)群やSTX群へと誘導するものであり、それらの変換は一部を除き、ほぼ定量的に進行する⁷⁾。この手法は藻類の培養と毒の単離、変換に基づいており、必要量を得るために時間とコストがかかる。

一方で、化学合成による手法の開発では東京農工大学の長澤らのグループは重要鍵中間体の開発に成功しており、多様な類縁体合成を可能としている⁸⁾。化学合成法は一部合成が困難なものもあるが、比較的短期間かつ多成分を大量に調製できる利点がある。国内での麻痺性貝毒標準物質の供給を考えた場合、将来的には藻類培養による供給を極力減らし、化学合成による手法を開発していくことが、切れ目のない標準物質供給と検査体制の維持を可能にすると考えられる(図3)。この時、万が一のSTX混入を避けるため、いずれの類縁体も毒性のない鏡像異性体を調製することは重要なポイントとなる。

昨今、TTXが食用二枚貝から機器分析によって検出されて問題となっている。規制対象とするかどうかは審議会等での議論を必要とするが、将来的にTTXの認証標準物質(certified reference material, CRM)も揃えるべき成分となりうる。TTXは不斉全合成が達成されているが⁹⁾、「国民保護法施行令第28条第10号に規定する生物剤及び毒素」に指定されており、報告等が必要である。こちらも鏡像異性体を調製し、毒性および分析化学的な同等性を明らかにすることで、毒性のないTTXのCRMを供給できる可能性がある。

毒物質の標準物質として、無毒の鏡像異性体を用いた例は筆者が知る限りなく、有意義な挑戦と考える。

4-2. 定量核磁気共鳴法を用いた麻痺性貝毒をはじめとする濃度決定法の開発

麻痺性貝毒は、極めて高い吸湿性を持ち、また乾燥やアルカリに弱く、水溶液にのみ溶解する化学的性質から、取り扱いが難しい化合物である。この物質の正確な定量は極めて困難で、過去には元素分析で濃度を決定する方法が用いられていた³⁾。2005年になると、核磁気共鳴装置(NMR)を用いて、外部標準による海洋生物毒の濃度決定法¹⁰⁾が報告され、NMRが実用レベルで精

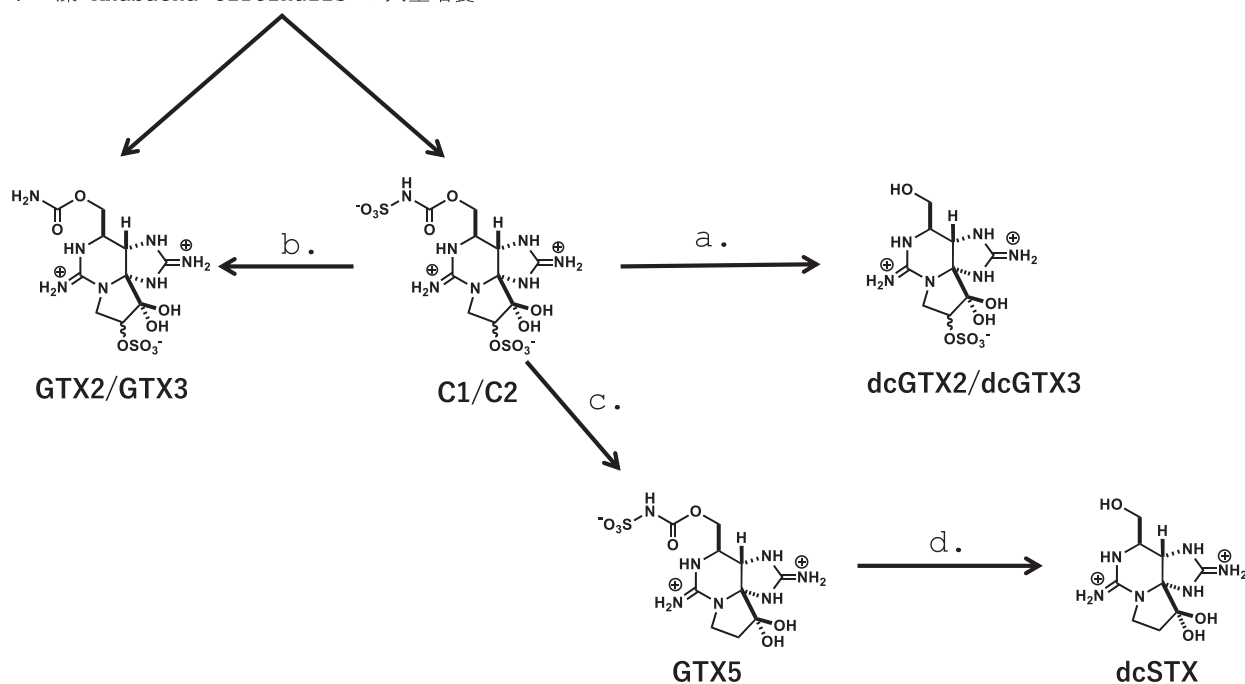
ラン藻 *Anabaena circinalis* の大量培養

図2 藻類培養(左写真)と化学変換を活用した麻痺性貝毒類縁体の調製法

(a) 0.1 mol/L KPB (pH 7.0), 75 °C, 1 h, yield: ~40% (b) 0.1 mol/L HCl aq., 100 °C, 15 min, yield: 90%
 (c) 1% DTT in 1% NH_4HCO_3 , 100 °C, 15 min, yield: 100% (d) 6 mol/L HCl, 110 °C, 3 h, yield: 100%

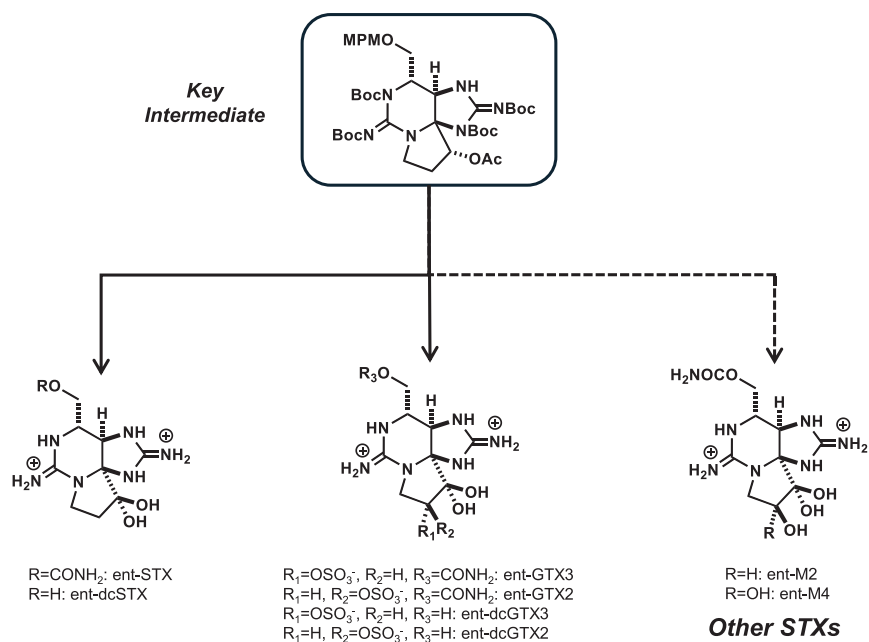


図3 重要鍵中間体を経由した各種鏡像異性体類の化学合成

確な濃度決定に使用できることが知られるようになった。この方法の良いところは、国際単位系に紐づけされたCRMを機器分析における標準物質として使うことで、定量した成分も国際単位系に紐づけることができる計量トレーサビリティが確保された分析法という点である。当初、私は、NMRを用いた濃度決定法として、内部標準に*tert*-butanolを用いた方法を開発し、GTX5とGTX6の定量に応用した。そして、濃度決定したGTX群をMBAに供し、マウス比毒性を算出した¹¹⁾。この方法の問題点は、単離した被検体物質を内部標準により汚染してしまうことである。毒の希少性などを鑑みて、外部標準法が望ましいと考え、PULCON (Pulse-length concentration determination) を取り入れた下痢性貝毒標準物質の開発に取り組んだ¹²⁾。この方法は、相反定理、すなわち、異なる溶液の二つのNMRスペクトル間のシグナル面積

にも相関関係が成り立つことを利用して定量するというものである¹³⁾。下痢性貝毒の一つであるオカダ酸は分子量が804であり、炭素鎖に結合した水素も多いが、複数の二重結合を分子内に有しているため、定量に必要な独立したシグナルが得やすかった。これらシグナルを使い、マレイン酸のCRMを用いた外部標準法の精確さを内部標準法 (基準は1,4-BTMSB-*d*₄) と比較し、本法による定量結果は、一般に精確性が高いとされる内部標準法とも遜色ない結果となることが明らかになった (表2)。こうした内部標準法や外部標準法を用いて、産業技術総合研究所計量標準総合センター (AIST/NMIJ) の協力のもと、下痢性貝毒のCRMの頒布に至った。これら技術開発を行い、麻痺性貝毒に対しても、外部標準法が適用できることを確認した。今後は開発した技術を使い、麻痺性貝毒のCRM調製を産総研と協力しながら実施

表2 オカダ酸を用いた内標法とPULCONの定量値の比較

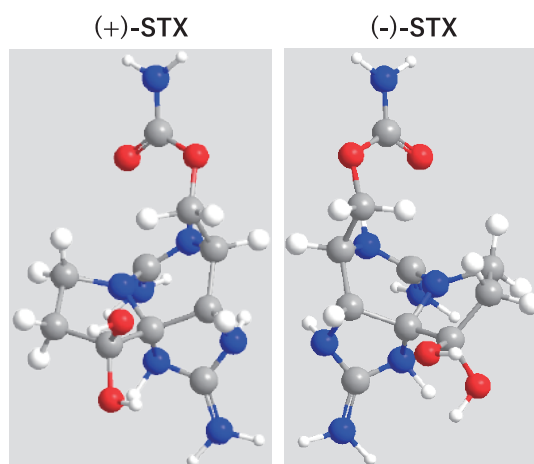
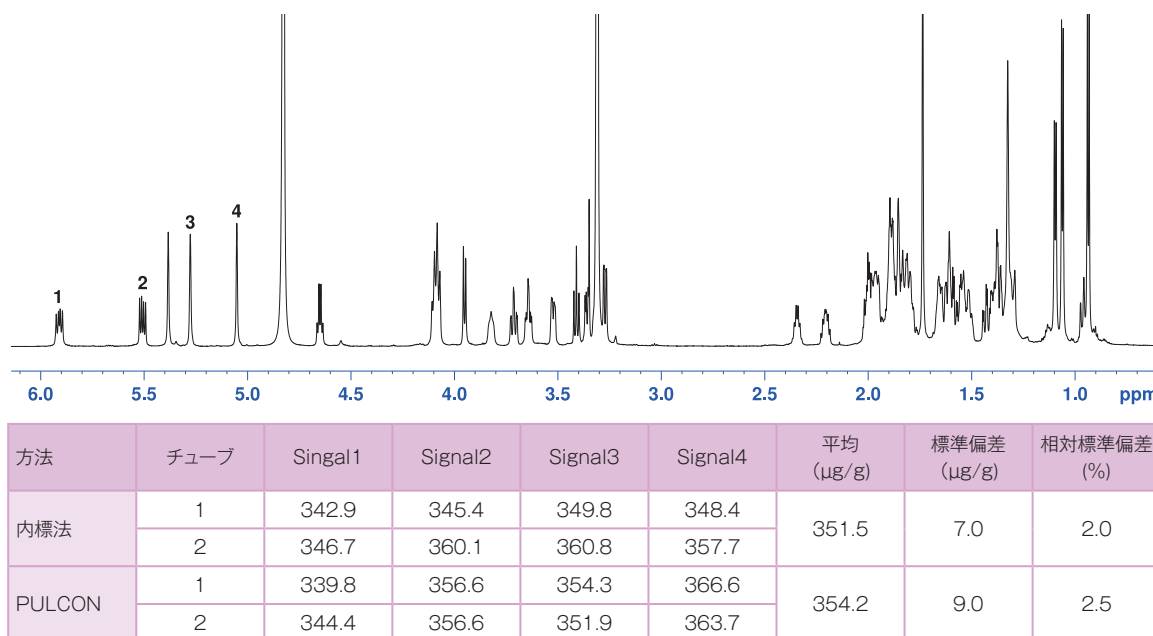


図4 サキシトキシンの立体構造
(左)天然型STX、(右)非天然型STX

する予定である。

4-3. サキシトキシン鏡像異性体の利用開発

STXは前述した通り、特定物質に規定されており、機器分析法への移行の大きな障害となっていた。ハーバード大学の岸らのグループによる麻痺性貝毒の合成研究において、STX類縁体の一つであるデカルバモイルサキシトキシン(decarbamoylsaxitoxin, dcSTX)の鏡像異性体には毒性がないことが報告されている¹⁴⁾。これに着目し、STXにおいても同様に鏡像異性体に毒性がなければ、分析用の標準物質として安全に利用できるのではないかとこの着想に至った(図4)。そこで、麻痺性貝毒の不斉合成経験を有している東京農工大学の長澤らがSTX鏡像異性体(*ent*-STX)を合成し、東北大学の山下・此木らはマウス神経芽細胞腫(Neuro2A)を用いた毒性試験を実施した。その結果、基準としたTTXに比べ(STXと同程度の毒性を有する)、ナトリウムチャンネル阻害活性として7500倍程度弱い毒性を示した。また、生体への影響を調査するためMBAを実施し、20 μg (100 MU相当の*ent*-STX)を腹腔内投与したが、麻痺性貝毒様の症状は示さず、試験に供した5匹のマウス全てが生存したことから、急性毒性はないと判断した。

次に、*ent*-STXの物理化学的な特性に基づく、分析化学特性を調べた。正確に比較するため、合成された*ent*-STXは、DSS-*d*₆のCRMを外部基準に用いた定量核磁気共鳴法によって精確に濃度を規定したものを使用した。その結果、*ent*-STXは実験した濃度

範囲において良好な直線性を示し、STXと同等の近似曲線を示した。また、化合物の同定に使用されるMS/MS断片化パターンを比較したところ、開裂パターン及び生じたピーク強度は一致した。このことから、*ent*-STXはSTXと同等の分析化学特性を有していることが明らかになった¹⁵⁾(図5)。

上述した成果を経済産業省に提供し、省内並びに外部有識者による審議会で検討した結果、STX鏡像異性体については特定物質として扱わない(STXを含む場合はこの限りではない)旨の通知が発出され、令和5年4月1日施行となった¹⁶⁾。現在、農林水産技術会議の委託プロジェクト研究「ホタテガイ等の麻痺性貝毒検査における機器分析導入に向けた標準物質製造技術の開発」において、国内で入手できないSTXとそれを含むネオサキシトキシン(neosaxitoxin, neoSTX)とdcSTXを対象に、それらの鏡像異性体の開発を進めている。この中で、*ent*-STXと*ent*-dcSTXの化学合成および濃度決定法はある程度終了しているため、近々標準物質の頒布を目指している。

麻痺性貝毒の機器分析法導入に向けた課題

05

機器分析法を国内に導入するにあたり、いくつか検討すべき課題がある。一つは、二枚貝に含まれるTTXである。1993年には既に国内二枚貝から検出され、その存在が報告されていたが¹⁷⁾、

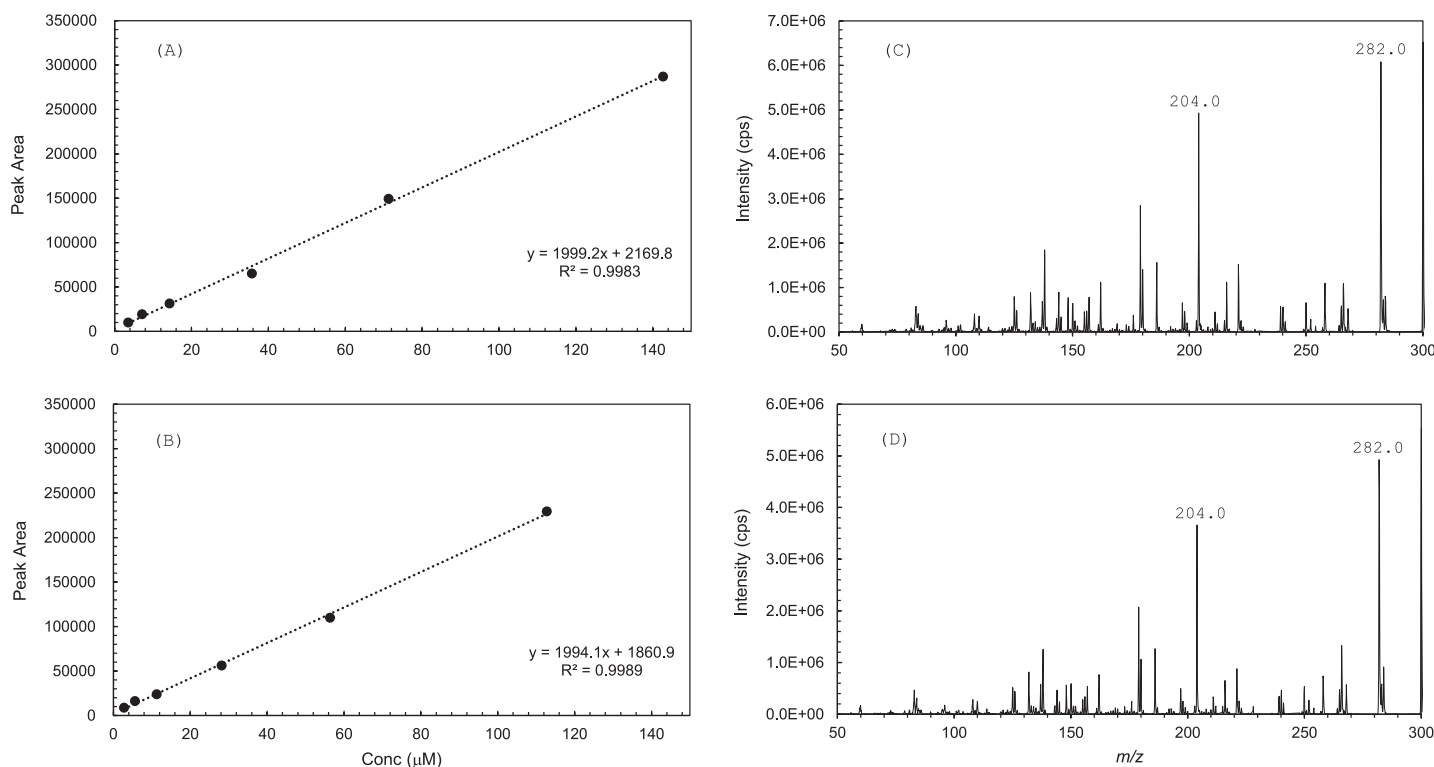


図5 STXと*ent*-STXの検量線(左)とMS/MSスペクトル(右)の比較
(A, C)STX, (B, D)*ent*-STX

当時はそれほど注目されることはなかった。しかし、質量分析装置を用いた検出法の世界的な普及にともない、日本以外の国々からも二枚貝中のTTXの検出事例が報告され、注目されるようになった。なお、現行のPSTsを対象としたMBAでは、二枚貝に含まれる有毒成分を一括して評価しているため、TTXも同時に検出していると言える。ただし、PSTsを対象としたMBAとTTXを対象としたMBAでは、マウス毒力の設定基準および定義が異なるため、わが国の公定法であるPSTsのMBAにおいて、TTXはTTXとしてではなく、PSTsの一成分として評価されていると考えることができる。機器分析法を導入する場合には、個別にTTXを評価するのか、PSTsと合わせた毒量評価とするのか判断が難しいところであるが、従来のMBAによる検査結果を踏襲するとすれば、後者を選ぶことになる。

もう一つの懸案は、二枚貝代謝物M-toxinsの存在である(表3)。M-toxinsの化学構造は一部の成分しか明らかにされていない^{18, 19)}。また、毒性評価がなされておらず、今後の研究課題である。M-toxinsも含めた標準物質供給体制の構築も不可欠である。現在、上述した委託プロジェクト研究では、関東化学株式会社と富士フイルム和光純薬株式会社にも協力いただき、*ent*-STXの標準物質頒布体制の構築を目指している。さらに、GTX群など麻痺性貝毒の主要成分についても製造・供給できる体制を構築

する必要があるが、これについて技術的な課題はそれほど多くはない。

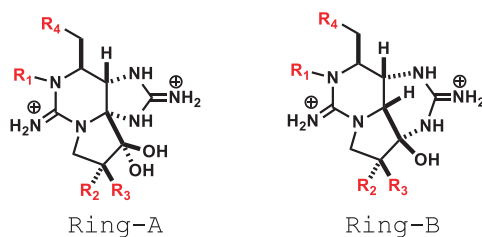
最後に、分析法の開発である。現行のアミドカラムを用いた方法は各成分を分離し定量することができるが、カラムの耐久性が逆相カラムと比較すると劣る。耐久性の向上が必須であるため、それ以外のカラムを用いた分析法も引き続き検討していきたい。

おわりに

06

麻痺性貝毒を検出するための動物を用いた検査法が導入されて以来、約40年が経過しようとしている。本動物試験法は十分機能しており、市場に流通した二枚貝を原因とする食中毒の発生事例はない。しかし、それを取り巻く環境は大きく変化し、検査に動物自体を用いない、あるいはその使用を減らすための代替検査法の開発や、分析装置または分析カラムの高性能化も相まって、動物を使用せずとも二枚貝に含まれる麻痺性貝毒を検出し、定量できる環境が整備されつつある。本稿で取り上げた麻痺性貝毒の機器分析法と、それを運用していくための標準物質の開発

表3 二枚貝に含まれる麻痺性貝毒代謝物の化学構造(一部推定含む)



Toxins	Ring	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
M1(α)	A	H	OH	H	-OCONHSO ₃ ⁻
M1(β)	A	H	H	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M2(α)	A	H	OH	H	-OCONH ₂
M2(β)	A	H	H	OH	-OCONH ₂
M3	A	H	OH	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M4	A	H	OH	OH	-OCONH ₂
M5-HA	B	H	OH	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M6-HA	B	H	OH	OH	-OCONH ₂
M7	A	OH	H	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M8	A	OH	H	OH	-OCONH ₂
M9	A	OH	OH	OH	-OCONHSO ₃ ⁻
M10	A	OH	OH	OH	-OCONH ₂

を通して、国内における新しい検査法を社会実装し、持続的に運用していける環境を醸成していきたい。

謝辞

07

本稿で紹介した研究の一部は、農林水産省「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業」におけるプロジェクト研究「有毒藻類の培養による各種貝毒標準品の製造技術の確立」、厚生労働科学研究費 補助金(食品の安全確保推進研究事業)「自然毒等のリスク管理のための研究(課題番号:21KA1005)」, 厚生労働科学研究費 補助金(食品の安全確保推進研究事業)「食品中の自然毒等のリスク管理のための研究(課題番号:24KA1001)」, 農林水産技術会議の委託プロジェクト研究「ホタテガイ等の麻痺性貝毒検査における機器分析導入に向けた標準物質製造技術の開発(課題番号:JPJ012710)」中で実施された。また、本稿を校閲いただいた北里大学 鈴木敏之教授、東京農工大学 長澤和夫教授、産業技術総合研究所 山崎太一博士にお礼申し上げます。関係者各位に深く謝意を表します。

参考文献

1. EURLMB, EURLMB SOP for the analysis of Paralytic shellfish toxins (PST) by precolumn HPLC-FLD according to OMA AOAC 2005.06, https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/PST_OMA-AOAC2005-06_HPLC-FLD_EURLMB.pdf (2025年3月5日アクセス)
2. A. Turner, R. Hatfield, M. Rapkova-Dhanji, D. Norton, M. Algoet, D. Lees, Single-Laboratory Validation of a Refined AOAC HPLC Method 2005.06 for Oysters, Cockles, and Clams in UK Shellfish, *J. AOAC int.*, 2010, 93, pp.1482-1493.
3. Y. Oshima, Post-column derivatization HPLC method for the analysis of Paralytic shellfish toxins, *J. AOAC int.*, 1995, 78, pp528-532.
4. E. Hignutt, Jr., Suitability of Postcolumn Oxidation Liquid Chromatography Method AOAC 2011.02 for Monitoring Paralytic Shellfish Toxins in Alaskan Shellfish—Initial Pilot Study versus Mouse Bioassay and In-House Validation. *J. AOAC int.*, 2014, 97, pp.293-298.
5. M. J. Boundy, A. I. Selwood, D. T. Harwood, P. S. McNabb, A. D. Turner, Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction, *J. Chromatogr. A*, 2015, 1384, p1-12
6. R. Watanabe, M. Kanamori, H. Yoshida, Y. Okumura, H. Uchida, R. Matsushima, H. Oikawa, T. Suzuki, Development of Ultra-Performance Liquid Chromatography with Post-Column Fluorescent Derivatization for the Rapid Detection of Saxitoxin Analogues and Analysis of Bivalve Monitoring Samples. *Toxins*, 2019, 11, p573.
7. (a) R. Watanabe, T. Suzuki, Y. Oshima, Preparation of Calibration Standards of N1-H Paralytic Shellfish Toxin Analogues by Large-Scale Culture of Cyanobacterium *Anabaena circinalis* (TA04). *Marine Drugs*, 2011, 9(3), 466-477. (b) T. Suzuki, R. Watanabe, A. Yoshino, H. Oikawa, H. Uchida, R. Matsushima, S. Nagai, T. Kamiyama, T. Yamazaki, M. Kawaguchi, T. Yaritha, A. Takatsu. Preparation of Diarrhetic Shellfish Toxins (DSTs) and Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) by Large Algal Culture and Chemical Conversion. A. Lincoln MacKenzie [Ed]. *Marine and Freshwater Harmful Algae 2014. Proceedings of the 16th International Conference on Harmful*
8. O. Iwamoto, K. Nagasawa, Total Synthesis of (+)-Decarbamoylsaxitoxin and (+)-Gonyautoxin 3, *Org. Lett.* 2010, 12, pp2150-2153
9. N. Ohyabu, T. Nishikawa, M. Isobe. First asymmetric total synthesis of tetrodotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 2003. 125. pp.8798-8805
10. I. W. Burton, M. A. Quilliam, J. A. Walter, Quantitative ¹H NMR with External Standards: Use in Preparation of Calibration Solutions for Algal Toxins and Other Natural Products, *Anal. Chem.* 2005, 77 (10), 3123-3131
11. R. Watanabe, T. Suzuki, Y. Oshima, Development of quantitative NMR method with internal standard for the standard solutions of paralytic shellfish toxins and characterisation of gonyautoxin-5 and gonyautoxin-6, *Toxicon*, 2010, 56, pp. 589-595
12. R. Watanabe, C. Sugai, T. Yamazaki, R. Matsushima, H. Uchida, M. Matsumiya, A. Takatsu, T. Suzuki, Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Based on PULCON Methodology: Application to Quantification of Invaluable Marine Toxin, Okadaic Acid. *Toxins*, 2016, 8(10), 294.
13. 「qNMR プライマリーガイド」ワーキンググループ, qNMR プライマリーガイド 基礎から実践まで, 共立出版, 2015, p58
14. C. Y. Hong, Y. Kishi, Enantioselective total synthesis of (-)-decarbamoylsaxitoxin, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, pp. 7001-7006.
15. R. Watanabe, Y. Takayanagi, O. Chiba, S. Itoda, H. Ishizuka, M. Odagi, M. Ozawa, H. Uchida, R. Matsushima, K. Konoki, M. Yotsu-Yamashita, K. Nagasawa, T. Suzuki. Nontoxic Enantiomeric Reference Materials for Saxitoxins. *Anal. Chem.* 2022, 94, pp.11144-11150.
16. 経済産業省, 「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」に係る特定物質の取扱いについて, https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/cwc/files/kaieihou_tokuteibushitsu_toriatsukai.pdf (2025年3月5日)
17. M. Kodama, S. Sato, T. Ogata, *Alexandrium tamarense* as a source of tetrodotoxin in the scallop *Patinopecten yessoensis*. Toxic phytoplankton blooms in the sea. 1993.
18. C. Dell'Aversano, J. A. Walter, I. W. Burton, D. J. Stirling, E. Fattorusso, M. A. Quilliam. Isolation and Structure Elucidation of New and Unusual Saxitoxin Analogues from Mussels. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, pp. 1518-1523.
19. S. Numano, Y. Kudo, Y. Cho, K. Konoki, Y. Kaga, K. Nagasawa, M. Yotsu-Yamashita. Two new skeletal analogues of saxitoxin found in the scallop, *Patinopecten yessoensis*, as possible metabolites of paralytic shellfish toxins. *Chemosphere*, 2021, 278, p.130224.

受理日: 2025年6月2日